

## Роль микробиома дыхательных путей в респираторном здоровье

*Д. Ю. Кобзев, Е. Н. Удовиченко, И. А. Перфилова, И. В. Гамова, И. Э. Михайлова, Л. В. Скучаева, Н. Г. Астафьева*

Часть 1

История открытия микромира, начавшаяся с изобретения микроскопа голландским натуралистом Антони ван Левенгуком в 1674 г., тесно переплетается с историей макромира, где центральной фигурой является человек и проблемы его здоровья. Эти непростые взаимосвязи рассматривались первоначально как антагонистические в результате доминирования микробной теории развития болезни. Начиная практически с античных времен предполагалось, что болезни человека вызываются «микроскопическими животными», а в последующем эта идея получила развитие, научное обоснование и конкретное подтверждение в концепции микробной теории развития болезней, научный фундамент которой заложили Луи Пастер, Роберт Кох и др. Укоренившийся стереотип необходимости борьбы с микроорганизмами как источником инфекционных заболеваний со времен основоположников микробной теории в последнее время уступил место новому взгляду на проблему взаимоотношения «человек–микроб».

Микробы, появившиеся около 3,5 млрд лет назад, являются самой древней группой организмов из ныне существующих на Земле. Повсеместная распространенность и суммарная мощность метаболического потенциала микроорганизмов определяют их важнейшую роль в круговороте веществ, поддержании динамического равновесия в биосфере Земли. Человек и микробы существуют друг с другом нераздельно, в организме человека обнаруживаются тысячи видов бактерий, архей, грибов и вирусов. Учитывая их огромное влияние на жизнедеятельность макроорганизма, современная наука рассматривает человека уже как суперорганизм, состоящий не только из соматических клеток, но и из огромного количества микроорганизмов. Тысячелетия взаимодействия микрофлоры и организма человека научили человека с помощью иммунной системы не только эффективно защищаться от патогенов, но и предотвращать аутоиммунные и аллергические заболевания — т. е. развили способность к иммунной регуляции или модуляции. Новые взгляды на взаимодействие иммунной системы с нормальной микробиотой как на самостоятельное явление, устанавливающее взаимоотношения с симбиотными микроорганизмами, являются современным подходом к пониманию живых систем, уточнению разнообразных типов многомерных взаимодействий и более полному пониманию сложных фенотипов аллергических и других иммунозависимых заболеваний. Растущая доступность высокопроизводительных технологий позволила провести общесистемное профилирование генома, транскриптома, эпигенома, микробиома и метаболома, изменила наши представления, обеспечивая фундамент для исследования астмы и аллергии на принципиально ином уровне, исходя из новой парадигмы сложного взаимодействия между микробиомом и его хозяином, которые могут провоцировать или препятствовать формированию респираторного заболевания.

### Терминология

Термины «микрофлора», «микробиота» и «микробиом» часто используются в литературе как синонимы. Однако существуют некоторые различия между ними. И хотя вопрос об их значении еще обсуждается, следует разграничивать понятия [1].

В связи с имеющимися в публикациях разночтениями по использованию некоторых терминов в контексте данной статьи предлагаются следующие уточнения.

Микрофлора — собирательное название микроорганизмов, находящихся в симбиозе с человеком, включает в себя популяцию видов микроорганизмов, которые живут на коже или внутри человеческого тела — синантропные бактерии, вирусы и грибы, а также другие одноклеточные микроорганизмы, такие как археи и простейшие, для которых организм человека является естественной средой обитания. Поскольку второй корень в данном слове в буквальном переводе звучит как «растительный мир» (дословный перевод слова «флора»), то предлагается использовать как синоним для обозначения микрофлоры более корректный термин «микробиота».

Нормофлора (нормальная микрофлора) — определенное качественное и количественное соотношение разнообразных популяций микробов отдельных органов и систем желудочно-кишечного тракта и других слизистых тканей, поддерживающее биохимическое, метаболическое и иммунологическое равновесие макроорганизма, необходимое для сохранения его нормального состояния.

Микробиом — все гены, находящиеся внутри данной микрофлоры (микробиоты), это совокупность геномов микроорганизмов, занимающих одну экологическую нишу, например, обитателей кожи человека или его кишечника.

Метагеном — весь генетический материал, получаемый из образца, например, содержимого кишечника. Метагеном — это набор генов всех микроорганизмов, находящихся в образце среды.

«Омиксные технологии» (название связано с одинаковым окончанием слов, входящих в сферу эффективных

экспериментальных дисциплин — геномика, протеомика, транскриптомика, метаболомика) возникли в результате стремительного развития технологий, позволяющих производить и анализировать большие объемы биологических данных. Современный «омиксный» инструментарий включает высокопроизводительные методы секвенирования ДНК (геномика), определения концентрации и активности белка (протеомика), метаболитов (метаболомика), регуляции экспрессии генов (эпигеномика), а также фармацевтические инструменты для поиска и тестирования новых лекарственных препаратов (фармакоэкономика).

Экспосом — различные воздействия, которые могут повлиять на развитие аллергического заболевания. Эти экспозиции включает в себя следующие три вида воздействий: 1) общая среда, включая городскую или сельскую местность, климат, загрязнение воздуха, образование; 2) конкретная внешняя среда, включая диету, физическую активность, воздействие табака, инфекции, род занятий; 3) внутреннее тело, окружающая среда. Эти факторы одновременно в совокупности с иными взаимодействуют друг с другом и влияют на формирование аллергических заболеваний и респираторной патологии. Экспозиционно-ориентированные проекты (Exposome-focused projects) необходимы для изучения сложного взаимодействия генетики, окружающей среды и микробиома [2].

## **Научные проекты по изучению микробиома человека**

Каждый человек (даже однояйцевые близнецы) имеет уникальную микробную ассоциацию, которая может быть подвержена ежедневным вариациям. Для идентификации и характеристики совокупности микроорганизмов человека был инициирован проект «Микробиом человека» (Human Microbiome Project — HMP). Проект «Микробиом человека» является логическим развитием проекта «Геном человека» (The Human Genome Project, HGP), целью которого была полная расшифровка человеческого генома. При реализации HGP были разработаны и усовершенствованы методы изучения генов человека, которые и легли в основу следующего за ним HMP. К революционизирующим технологиям при изучении геномов можно отнести разработку в 1985 г. полимеразной цепной реакции (ПЦР) — наиболее чувствительного до сих пор метода детектирования ДНК [3].

Официально научная программа «Геном человека» с участием ведущих молекулярно-генетических лабораторий США, Западной Европы, России и Японии оформилась и стартовала в 1990 г., а первый полный геном человека был описан и опубликован в 2003-м, этот проект до сих пор окончательно не завершен, так как нерасшифрованными остаются некоторые участки человеческой ДНК [4].

Начало выполнения проекта «Микробиом человека» — 2008 г., когда Национальные институты здравоохранения США (National Institutes of Health, NIH) поставили цель — описать бактериальную жизнь, связанную с организмом человека, используя технологии проекта «Геном человека».

За сравнительно короткое время (2007–2014 гг.) ученые смогли составить новое представление о многообразии микрофлоры тела человека [5, 6]. Около 200 ученых почти из 80 научно-исследовательских институтов США работали в течение пяти лет над этой первой в истории «переписью» микроорганизмов, которые проживают на всех биотопах (местах обитания) человека. Они расшифровывали ДНК микробов, используя некоторые из тех методов, которые применяются в человеческой генетике. Каталогизация необходимых и достаточных наборов микробиот, которые поддерживают здоровье, и нормальные диапазоны этих особенностей у здоровых популяций являются важным первым шагом к выявлению и исправлению микробных конфигураций, которые участвуют в болезни [7, 8].

В 2014 г. с целью генерирования ресурсов для характеристики микробиома и выяснения роли микробов в состоянии здоровья и болезненных состояниях стартовала вторая фаза этого крупного международного многопрофильного проекта — Integrative Human Microbiome Project (iHMP) (в настоящее время опубликованы ключевые результаты) [9, 10]. Миссия проекта заключалась в создании интегрированных продольных наборов данных биологических свойств как из микробиома, так и из организма-хозяина с использованием различных «омикс»-технологий.

«Омиксные методы» революционизировали методологию экспериментальной биологии, анализа данных и их интеграции. Усилился акцент на функцию, структуру, эволюцию геномов. Сегодня появилась возможность анализировать первичные структуры геномов, экспрессию генов в них, выявлять различные уровни регуляции и взаимосвязи между ними. Инструментально произошел переход от микрочипов к так называемому высокопроизводительному полногеномному секвенированию, исследуется весь набор ДНК, содержащийся в отдельной клетке, клеточных популяциях или сообществах организмов, и анализируется работа всех генов одновременно. Новые экспериментальные технологии порождают огромные объемы данных (Big Data), анализировать которые можно только методами биоинформатики, в основе которой лежит синтез биологических и математических знаний.

Долгое время при секвенировании геномов микроорганизмов в качестве источников ДНК использовались, как правило, культуры одинаковых клеток. Однако ранние исследования показали, что во многих средах обитания присутствуют большие группы микроорганизмов, которые нельзя вырастить в лабораторной культуре и, следовательно, секвенировать их геномы. Необходимость разработки соответствующих новых (некультуральных) методов исследований микрофлоры [11], в свою очередь, ускорила развитие такого направления в изучении

микробов и здоровья человека, как «метагеномика» [12]. Метагеномный анализ позволяет определить видовое разнообразие исследуемого образца без необходимости выделения и культивирования микроорганизмов. Секвенирование и анализ генов из целых сообществ, а не из отдельных геномов показали, что микробы функционируют внутри сообществ, а не как отдельные виды. Этот сдвиг от акцента на отдельных организмах к микробным взаимодействиям был полноценно охарактеризован в докладе Национальной академии наук США (National Academy of Sciences, NAS) в 2007 г., в котором изложены проблемы и перспективы метагеномики как способа понимания основополагающей роли микробных сообществ в целом в окружающей среде, так и в окружающей среде и здоровье человека [13]. Сфера метагеномики огромна. Определение метагеномных характеристик микробных сообществ было представлено в таких проектах, как «Исследование состава биоты желудочно-кишечного тракта человека» (Metagenomics of the Human Intestinal Tract Consortium, MetaHIT) — MetaHIT initiatives, The International Human Microbiome Consortium [14]. В РФ «Метагеномный анализ биоценоза желудочно-кишечного тракта» выполняется в рамках консорциума «Русский метагеном» [15], в том числе уточняется роль сообщества микроорганизмов дыхательных путей при респираторной патологии [16, 17].

## Методы исследований и эволюция представлений о микробиоте и микробиоме

На протяжении многих лет, со времен Пастера и Коха, для изучения микробного разнообразия, селективного выделения представителей основных функциональных групп, в том числе патогенных микроорганизмов, использовались бактериоскопические и бактериологические (культуральные) методы. Используемые с конца XIX в. культуральные анализы (посевы) выявляли не более 1% микрофлоры. Особые проблемы возникали при культивировании анаэробов. В 1985–1993 гг. пришедшие на смену классическим микробиологическим подходам физико-химические методы анализа и молекулярно-генетические методы (ПЦР) позволили определить, что в кишечнике, например, обитает около 1000 видов микроорганизмов, 99% из которых анаэробные. При проведении ПЦР в реальном времени одновременно происходят амплификация, детекция и количественное определение специфической последовательности ДНК в образце, автоматическая регистрация и интерпретация полученных результатов [18].

Особой вехой в науке и медицине стали работы по секвенированию генома. Новые открытия позволили осознать, что человек — не только продукт своих собственных генов. Для полного понимания генетического материала нужно секвенировать геномы бактерий человека — из кишечника, с кожи, из носового канала, ротовой полости, дыхательных и мочеполовых путей. К началу XXI в. для исследования микробной популяции кишечника применили метод секвенирования генов 16S рРНК. Ген, кодирующий 16S рибосомальную РНК, стал идеальным маркером для идентификации микроорганизмов. Этот ген есть в геноме всех бактерий и архей, но отсутствует у эукариот и вирусов, имеет как консервативные участки, одинаковые у всех прокариот, так и видоспецифичные. Нуклеотидные последовательности 16S РНК всех известных бактерий общедоступны (генный банк). Секвенирование ДНК (определение нуклеотидной последовательности генов 16S РНК) позволило установить, что в кишечнике живет более тысячи видов микроорганизмов, но только 10% микрофлоры поддается культивированию [19].

С помощью глобального проекта «Микробиом человека» на сегодняшний день расшифровано около 3 млн генов микроорганизмов, что примерно в 150 раз превышает набор генов человека. В силу этого человек приобрел статус «суперорганизма», в котором сосуществует большое количество различных организмов [8, 20].



Рис. 1. Соотношение генов организма и микробиома

На рис. 1 показано соотношение генов организма (22 000) и микробиома (8 000 000), от которого зависит степень их возможного влияния на различные функции.

По своей сути этот рисунок иллюстрирует ставший популярным слоган «Вы — это Ваши бактерии» и слова научных популяризаторов: «Мы живем в мире микробов: они его заселили, преобразовали, сделали пригодным для нашей жизни и... превратили нас в среду своего обитания. Можно сколько угодно говорить о взаимоотношениях «хозяин — его микроб», но только кто тут хозяин, вот вопрос» [21].

В любом случае не следует рассматривать микроорганизмы, обитающие в различных локусах организма хозяина,

как пассивные участники системы. С функциональной точки зрения их можно оценивать как еще один орган человека. По различным оценкам масса этого органа может достигать нескольких килограммов, а генетическое разнообразие в сотни раз больше генома человека. Изучение функции этого органа в норме и патологии — актуальная задача медицины настоящего и будущего.

## Микробиом верхних дыхательных путей и его роль в респираторном здоровье

Наиболее полный анализ микробиоты человека в ходе реализации проекта HMP [5] при рассмотрении 27 отдельных участков тела выявил наличие 22 бактериальных фил, причем большинство последовательностей (92,3%) были связаны только с четырьмя филами:

- 1) *Actinobacteria* (36,6%);
- 2) *Firmicutes* (34,3%);
- 3) *Proteobacteria* (11,9%);
- 4) *Bacteroides* (9,5%).

Анализ сайтов распределения бактериальных фил (групп микроорганизмов, объединенных общим родством) у человека по анализу 16S рРНК-секвенирования показал, что самой населенной частью организма является пищеварительный тракт, где обитает 75–78% микроорганизмов — в основном бактерий (*Firmicutes*, *Bacteroides*, *Actinobacteria* и *Proteobacteria*), в выстилке кишечника обнаруживается от 5000 до 35 000 видов микроорганизмов. Эти факты укладывались в картину традиционных представлений о том, что желудочно-кишечный тракт связан с наиболее высокой бактериальной нагрузкой. Стандартные методы исследования образцов, полученных из локусов с высокой бактериальной нагрузкой, потребовали модификации при изучении сайтов, считавшихся стерильными (легкие), чтобы при обработке ДНК исключить фоновое загрязнение и более четко интерпретировать данные в зависимости от типа образца, объема, анатомического участка и клинических параметров [22].

Изучение физиологической роли микробиоты верхних дыхательных путей (ВДП) представляет особый интерес в свете концепции единства дыхательных путей (United Airways Disease), согласно которой верхние и нижние дыхательные пути считаются единой морфологической и функциональной единицей [23, 24], а связь, существующая между ними, наблюдается в течение многих лет как в отношении здоровья, так и в отношении заболеваний. Анатомические особенности строения дыхательных путей (короткое расстояние от ноздрей до альвеол — 0,5 м, отсутствие каких-либо физических барьеров при открытой гортани) обеспечивают быструю микробную иммиграцию в нижние отделы дыхательных путей. Изменения микробных сообществ в ВДП у здоровых индивидов и при патологии позволяют лучше понимать их роль в регуляции иммунного контроля в дыхательных путях.

Связь между носовой микробиотой и реактивным, аллергическим или неаллергическим воспалением как верхних, так и нижних дыхательных путей включает сложную сеть процессов, начиная от рождения до старости. У новорожденных колонизация ВДП происходит в течение первых 2–3 суток. Возрастные особенности расселения микрофлоры представлены в обзорной статье [25].

Сразу же после родов микробиота дыхательных путей новорожденного аналогична материнской. Микробиота новорожденных относительно однородна по всем участкам дыхательных путей, но очень быстро (в течение дней и недель) дифференцируется в сообщества, специфичные для верхних и нижних дыхательных путей. Примерно до трех лет микробиота ВДП похожа на кишечную, после чего она приобретает относительную специфичность [26].

Адекватное созревание микробиома кишечника в ранний период может являться мощным протективным фактором в отношении бронхиальной астмы [27]. Ранняя колонизация кишечника *Firmicutes*, *Clostridia* и *Bacteroides* (преобладание у недоношенных) при снижении уровня *Lactobacillus* и *Bifidobacteria*, скудное микробное разнообразие predisполагают к развитию атопии.

Проспективное наблюдение показало, что у детей в возрасте 1 года с незрелой микробной композицией кишечника наблюдается повышенный риск развития астмы в возрасте 5 лет. Эта ассоциация проявляется только у детей, родившихся у астматических матерей, что свидетельствует о том, что отсутствие микробной стимуляции в течение первого года жизни может спровоцировать наследственный риск астмы. Напротив, адекватное созревание микробиома кишечника в этот период может защитить этих детей. Эти находки отчасти поддерживают «гигиеническую гипотезу» увеличения числа больных с аллергическими заболеваниями. Разнообразие микробиома слизистой оболочки ВДП, вероятно, отражает бесперебойный баланс полезных микроорганизмов и патогенных микроорганизмов, таких как *Moraxella catarrhalis*, который связан с последующим развитием астмы и пневмонии. Кроме того, такие роды, как *Ruminococcus* и *Bacteroides* — специфические ферментеры растительных волокон, участвуют в защите от астмы посредством производства короткоцепочечных жирных кислот, летучих веществ, способных снижать аллергическое воспаление дыхательных путей, опосредованное клетками Т-хелперов типа 2 [28].

В отличие от традиционно проводимых культуральных исследований по ассоциации конкретных бактериальных паттернов с воспалительными профилями заболеваний, методы молекулярной биологии позволили выявлять более



разнообразную микробиоту, чем считалось ранее, в том числе в ВДП, и высказать предположение о дополнительном защитном эффекте микробного разнообразия на астму. Первые результаты секвенирования по отношению к дыхательным путям здоровых субъектов привели к следующим фундаментальным выводам: у здоровых людей не только верхние, но и нижние дыхательные пути в норме содержат различные сообщества микроорганизмов. Дыхательные пути пациентов с респираторными заболеваниями содержат различные бактериальные сообщества, которые относительно обогащены типом *Proteobacteria* [29].

ВДП являются магистральным путем для осаждения бактериальных клеток из воздуха. Идентифицированы доминантные микроорганизмы на слизистых ВДП по ходу воздушного потока, начиная от ноздрей, полости носа, носоглотки [30]. Типичной резидентной флорой в этих локусах являются представители *Actinobacteria*, *Firmicutes* и *Proteobacteria*.

При заболеваниях ВДП, включая аллергический ринит, хронический риносинусит с полипами или без полипов, муковисцидоз, характер микробиоты и воспалительные профили существенно отличаются [31].

Для понимания их роли в патогенезе астмы важную роль сыграли дополнительные исследования носовых таксонов с помощью секвенирования 16S рибосомной РНК. Существуют различия в микробиоме носа у больных с астмой при обострении и стабильном течении. Носовая микробиота у пациентов со стабильной астмой была обогащена таксонами из *Bacteroides* и *Proteobacteria*. При обострении астмы более широко представлены четыре вида — *Prevotella buccalis*, *Dialister invisus*, *Gardnerella vaginalis*, *Alkanindiges hongkongensis*. Такие различия не исключают возможности использования назальных таксонов как биомаркеров активности астмы [32].

Существует определенная топографическая непрерывность бактериальных популяций в респираторном тракте человека [33], следующим вслед за носом сайтом, детально изученным, стала микробиота носоглотки.

Микробиота носоглотки рассматривается как детерминанта для распространения инфекции на нижние дыхательные пути, тяжести сопровождающих воспалительных симптомов и риска развития будущей астмы. С одной стороны, носоглотка — резервуар для микробов, связанных с острыми респираторными инфекциями (ОРИ). Но пневмонии, возникающие в результате ОРИ в младенчестве, связаны с развитием астмы. Изучение микробиома носоглотки у 234 детей в течение критического первого года жизни показало, что у большинства младенцев первоначально отмечена колонизация *Staphylococcus* или *Corynebacterium*, в последующем — стабильная колонизация *Alloisococcus* или *Moraxella*. Вирусы инициировали преходящие вторжения *Streptococcus*, *Moraxella* или *Haemophilus*. Ранняя бессимптомная колонизация *Streptococcus* была сильным предиктором астмы, а использование антибиотиков нарушало бессимптомные образцы колонизации. В отсутствие эффективных антивирусных терапий нацеливание на патогенные бактерии в микробиоме носоглотки может представлять собой профилактический подход к астме [34].

В систематическом обзоре исследований микробиома околоносовых пазух, в которых использовали глубокое секвенирование гена рибосомальной РНК 16S [35], дана информация о выявлении в среднем 1587 таксонов (диапазон 911–2330). Несмотря на гетерогенность исследований, в каждой выборке контрольных пациентов и пациентов с хроническими риносинуситами были идентифицированы филы *Firmicutes*, *Actinobacteria* и *Bacteroides*. Не было обнаружено существенных различий между микробиотой здоровых и микробиотой пациентов с хроническим риносинуситом, но при некоторых фено/эндотипах хронического риносинусита отмечалось обогащение золотистым стафилококком.

Исследование специфического влияния конкретных бактерий на иммунный ответ слизистых носа и околоносовых пазух проливает новый свет на патофизиологию как хронических ринитов, риносинуситов, так и их влияния на астму [31].

Окончание статьи читайте в следующем номере.

**Н. Г. Астафьева\***<sup>1</sup>, доктор медицинских наук, профессор

**Д. Ю. Кобзев\*\***, доктор медицинских наук, профессор

**И. В. Гамова\***, кандидат медицинских наук

**И. А. Перфилова\***, кандидат медицинских наук

**Е. Н. Удовиченко\***, кандидат медицинских наук

**Л. В. Скучаева\***, кандидат медицинских наук

**И. Э. Михайлова\***

\* ФГБОУ ВО СГМУ им. В. И. Разумовского МЗ РФ, Саратов

\*\* Лидс Тринити университет, Лидс, Великобритания

<sup>1</sup> Контактная информация: [astang@mail.ru](mailto:astang@mail.ru)

Роль микробиома дыхательных путей в респираторном здоровье (часть 1)/ Н. Г. Астафьева, Д. Ю. Кобзев, И. В. Гамова, И. А. Перфилова, Е. Н. Удовиченко, Л. В. Скучаева, И. Э. Михайлова  
Для цитирования: Лечащий врач № 4/2019; Номера страниц в выпуске: 12-15  
Теги: микробиом человека, воспаление, бронхиальная обструкция.

---

© «Открытые системы», 1992-2019. Все права  
защищены.